植 物 分 类 学 报 36(2):128～133(1998)
Acta Phytotaxonomica Sinica

短柄五加种子结构、后熟作用及其细胞化学研究*

[1]田国伟** [2]王仲礼 [2]刘林德 [2]申家恒***
[1](哈尔滨师范大学生物系 哈尔滨 150080) [2](烟台师范学院生物系 烟台 264025)

STUDIES ON THE STRUCTURE, AFTERRIPENING AND CYTOCHEMISTRY OF SEEDS IN *ELEUTHEROCOCCUS BRACHYPUS* HARMS

[1]TIAN Guo-Wei** [2]WANG Zhong-Li [2]LIU Lin-De [2]SHEN Jia-Heng***
[1](*Department of Biology, Harbin Normal University*, Harbin 150080)
[2](*Department of Biology, Yantai Normal University*, Yantai 264025)

Abstract Seeds of *Eleutherococcus brachypus* Harms were flat-kidney-shaped and their seed coats were only composed of one layer of cells. Embryos with abundant protein in their cells were just at the heart-shaped stage and were capped by sacs formed from degenerating endosperm cells when seeds shed from their maternal plants. A large amount of stored protein grains and lipids existed in endosperm cells but no polysaccharide grains were present either in endosperm cells or in embryo cells. Viable seeds were only 9.27% of the total. The plump seeds germinated in the cultivated field after 18～19 months and their germinating rate was 1.67%. Besides, the content of protein decreased gradually and a few polysaccharide grains were stored in embryo cells during the process. The afterripening process of seeds stratified at different temperatures ended after 6 months and the cytochemistry features of the seeds were that the content of protein decreased gradually and numerous polysaccharide grains had been stored in embryo cells at the late heart-shaped embryo stage and retained till the mature embryo stage. The structure, afterripening and cytochemistry of seeds were compared between *Eleutherococcus brachypus* and *Eleutherococcus senticosus*. The poor quality of the seeds, longer time of afterripening in a natural state and much lower germination rate of *E. brachypus* are considered to be important reasons for the endangerment of this species. Some measures are suggested for its conservation based on the above facts.

Key words *Eleutherococcus brachypus* Harms; Seed structure; Afterripening; Cytochemistry; Endangered plant

摘要 短柄五加 *Eleutherococcus brachypus* Harms 种子为扁肾形,种皮由一层细胞构成。种子脱落时,胚为心形胚期,胚周围的胚乳细胞解体形成液样囊腔,并包裹胚,胚细胞中存在较多蛋白质,胚乳细胞贮存大量蛋白质颗粒和脂类,但两者均未见多糖颗粒。有萌发潜能的种子只占全部种子的9.27%。在试验地种植条件下饱满种子经18～19个月后萌发,出苗率为1.67%,该过程细胞化学特点是胚细胞中蛋白质含量逐渐减少,并逐渐积累少量多糖颗粒。种子经变温层积处理6个月即可完成后熟过程,其细胞化学特点是胚细胞中蛋白质含量逐渐减少,但在心形胚后期即已积累大量多糖颗粒,并一直保持至胚完全发育成熟。经比较短柄五加与刺五加的种子结构、后熟作用及其细胞化学特点,认为短柄五加种子

* 国家自然科学基金重大项目(项目编号:39391500)资助课题。
** 现通讯地址:北京大学生命科学学院,北京,100871。
*** 通讯联系人。
1997-05-23 收稿,1997-09-29 收修改稿。

质量差、自然状态下后熟时间长和出苗率低是短柄五加致濒的重要生殖因素,并提出了相应保护方法。

关键词　短柄五加;种子结构;后熟作用;细胞化学;濒危植物

短柄五加 *Eleutherococcus brachypus* Harms 为五加科植物,在我国只分布于陕甘宁边区(马德兹,刘惠兰,1986;向其柏,1985;何景,曾沧江,1978),个体数量很少,是一种濒危植物。濒危植物的致濒原因很多,植物生殖过程的成功与否是植物致濒的重要因素之一(樊汝汶等,1992; Boyd & Serafini, 1992; Herrera, 1991; Kevan *et al*., 1991;程志英等,1990;Wiens *et al*.,1989;马信祥等,1988)。生殖过程任何一个环节的断裂,都会造成生殖失败,导致植物濒危。所以濒危植物的生殖生物学研究是揭示其致濒机制、探讨解除濒危状态及提供保护措施的重要内容之一。关于五加科的生殖生物学工作不多(刘林德,1996),目前还未见有短柄五加生殖生物学方面的报道。因此,我们对短柄五加的生殖生物学进行了全面系统的研究,以揭示其生殖过程是否存在致濒因素。本文是该研究的一部分,着重探讨短柄五加种子这一环节与其濒危是否有关。

1　材料和方法

短柄五加 *Eleutherococcus brachypus* Harms 种子采集于陕西省南泥湾镇。每年 10 月上旬至中旬,采集短柄五加果实,用水浸泡并搓洗去果皮和果肉,挑出饱满种子(含内果皮),自然干燥备用。

1.1　种子活力测定　采用常规四唑(TTC)法染色测定饱满种子胚的活力。

1.2　种子后熟过程层积处理方法　种子经 70%酒精消毒 1~2 min,置于经高温灭菌的湿砂中。将种子与湿砂体积比例约为 1:5, 置于塑料袋内,定期通气和保持砂子湿润。经下列处理:(1)20±1 ℃ 处理 6 个月;(2) 5±1 ℃ 处理 6 个月;(3) 先经 20±1 ℃处理 2.5~3 个月,然后再经 5±1 ℃ 处理 2.5~3 个月。

1.3　试验地种植种子后熟过程处理方法　取 10 组(每组 100 粒)短柄五加种子缝置于塑料纱网中,于当年(1994 年)10 月中旬种植于哈尔滨师范大学生物园实验地内,定期观察并挖取种子,观察种子状态,并固定备用。

1.4　细胞化学染色方法　短柄五加种子经卡诺液固定,常规石蜡法制片。切片厚度 8~10 μm。按常规细胞化学染色方法,切片分别经 PAS 反应鉴别多糖,汞-溴酚蓝染色鉴别蛋白质;取未固定种子做徒手切片,用苏丹黑 B 染色鉴别脂类,三氯化铁染色鉴别单宁。部分种子经卡诺固定液固定,解剖出种子胚,经埃氏苏木精整体染色。所有光镜材料均置于 Olympus BH-2 型光学显微镜观察并照相。

1.5　扫描电镜观察　将自然干燥的种子按不同方向直接粘于双面胶带上,然后喷金镀膜,于 H-520 型扫描电子显微镜下观察并照相。

2　观察结果

短柄五加子房 5 室,每室有上、下两个胚珠,上胚珠早期退化,下胚珠为正常可育胚珠。可育胚珠倒生,单珠被,厚珠心。

2.1　短柄五加种子状态与生活力测定

随机取短柄五加成熟果实 500 个,统计其种子状态如表 1 所示。将其饱满种子的胚解剖出来,采用 TTC 法染色,测定种子生活力,结果如表 2 所示。

表1 短柄五加种子状态
Table 1 The state of seeds of *Eleutherococcus brachypus* Harms

果实数 Number of fruits	种子总数 Total number of seeds	种子数/果实 Number of seeds per fruit	饱满种子(%) Plump seeds (%)	不饱满种子(%) Nonplump seeds (%)	空瘪种子(%) Shrivelled seeds (%)	虫食种子(%) Seeds eaten by insects(%)
500	2341	4.68	1128(48.18%)	478(20.42%)	663(28.32%)	72(3.08%)

表2 短柄五加饱满种子的生活力
Table 2 The plump seeds vigors of *Eleutherococcus brachypus* Harms

胚总数 Total number of embryos	无色胚(%) Non-colored embryos (%)	着色胚 Colored embryos	
		红色胚(%) Red-colored embryos(%)	粉色胚(%) Pink-colored embryos(%)
213	172(80.75%)	24(11.27%)	17(7.98%)

着色胚皆具生命力。胚染成红色者,生命力较强;胚染成粉红色者,生命力较弱;无色胚为丧失生命力的种子。测得短柄五加饱满种子中只有19.25%具生活力,事实上具有潜在萌发能力的种子只占全部种子9.27%。以上结果表明短柄五加种子质量很差。

2.2 短柄五加种子形态结构及其细胞化学

短柄五加种子为扁肾形,两面微凸(图版Ⅰ:1)。种子(含内果皮)平均大小为4.80×2.28 mm(长×宽),千粒重为5118 mg。

短柄五加种子的种皮只由一层细胞组成。种皮细胞排列紧密,靠胚乳一侧细胞壁和径向壁有纤维加厚,被PAS反应染成深红色(图版Ⅰ:5A)。种皮细胞自然状态下呈棕黄色。经三绿化铁反应染色鉴定,种皮细胞内不含有单宁物质。果实成熟时,内果皮骨质化,由6~8层细胞壁加厚的纤维状细胞紧密交织排列组成(图版Ⅰ:2),紧紧包裹种子,但在内果皮种柄部位则由薄壁细胞构成。当种子贮存一段时间后,该处细胞干瘪脱落而形成一小孔(图版Ⅰ:3)。

种子脱落时,胚尚未完全发育成熟,为心形胚初期。胚位于种子一端(珠孔端),体积很小,约占整个种子长度的1/20。胚细胞质和核仁均被汞-溴酚蓝染成深蓝色表明存在较多蛋白质,但未见贮存多糖,整个胚浸在解体胚乳细胞形成的粘液状囊腔中(图版Ⅰ:4)。

胚乳占据了种子绝大部分体积,其细胞中贮存大量蛋白质颗粒(图版Ⅰ:5A,5B)和脂类(图版Ⅰ:6),但未见多糖颗粒。胚周围的胚乳细胞解体,形成一液样囊腔包裹着胚,并以不规则突起方式深入到胚乳组织深处。该囊腔呈强PAS正反应,表明其中存在大量多糖物质(图版Ⅰ:4)。

2.3 短柄五加种子试验地种植后熟过程及其细胞化学

短柄五加饱满种子于当年秋季(10月下旬)播种于实验地中,到第3年春季(4月下旬至5月下旬,约18~19个月)种子开始萌发出苗,出苗率约为1.67%,另有约5%种子无任何萌发迹象。切片观察其种胚仍为心形胚时期,而其余约93%种子被菌类、土壤中虫类取食和受其他物理、化学条件影响而遭破坏。该过程细胞化学特点如下:(1)随种子处理时间的延长,种胚不断长大,胚细胞中汞-溴酚蓝染色逐渐变浅,表明胚细胞中总蛋白含

量在减少;从处理一年期种子一直到种子萌发前,胚细胞中只观察到少量细小的多糖颗粒(图版Ⅰ:7,8)。(2)胚乳的细胞化学特点无明显变化,但从子叶胚时期开始,珠孔端胚根附近的一些胚乳细胞中随贮存蛋白质颗粒的解体,出现一些多糖颗粒(图版Ⅰ:9)。

2.4 短柄五加种子层积处理后熟过程及其细胞化学

短柄五加种子经 5±1℃层积处理 6 个月,种胚只稍有发育,仍为心形胚时期。种子经 20±1℃层积处理 6 个月,种胚发育成较大心形胚期。但种子经 20±1℃层积处理 2.5～3 个月后,再经 5±1℃层积处理 2.5～3 个月,部分种胚可完全发育成熟,其出苗率有待进一步研究,但根据饱满种子生活力测定结果,出苗率应不会高于19.25%。该层积变温处理种子的细胞化学特点为:(1)20±1℃层积处理 2.5～3 个月,为较大心形胚时期,胚细胞中汞-溴酚蓝染色变浅,但细胞内已开始积累一些多糖颗粒(图版Ⅱ:1)。(2)再经 5±1℃层积处理 1 个月,胚体积增大(图版Ⅱ:3),大部分胚细胞中积累大量多糖颗粒(图版Ⅱ:2);处理 2 个月,为近成熟的子叶胚时期(图版Ⅱ:4),胚体表皮下有 7～8 层细胞中贮存大量多糖颗粒(图版Ⅱ:4,5)。该特点一直保持至种胚完全发育成熟。从子叶胚时期开始,珠孔端胚根附近一些胚乳细胞中也出现一些多糖颗粒。另外,经变温处理 6 个月后,仍有部分种子基本没有变化(图版Ⅱ:6),推测这部分种子是属于生活力较弱的类型。

3 讨 论

在本研究中,短柄五加种子结构、后熟作用及其细胞化学特点均与刺五加(另文报道)很相似,但也有一些不同点,主要表现在:(1)短柄五加种子大小和千粒重明显小于刺五加种子;(2)短柄五加种子外面骨质化的内果皮比刺五加的薄;(3)短柄五加种子质量比刺五加更差,有萌发能力的种子占全部种子的百分比(9.27%)低于刺五加(12.80%);(4)短柄五加饱满种子在试验地种植条件下的出苗率(1.67%)明显小于刺五加(10%)。可见,与刺五加相比,短柄五加有性生殖过程中的种子这一环节更为薄弱。从短柄五加种子试验地种植条件下的后熟过程(18～19 个月)可以推知其自然状态下种子后熟也需经较长时间,同时,短柄五加种子要经受各种环境压力的选择(土壤中细菌、虫类侵袭和各种物理、化学因素的影响等),其中绝大部分种子被破坏掉了。短柄五加种子质量差、自然状态下后熟时间长和出苗率低这些特点大大限制了短柄五加有性生殖的成功率,故上述特点可能是短柄五加致濒的重要因素。因种子这一环节薄弱而使植物致濒的情况在另一些植物中也有报道(Boyd & Serafini, 1992 ;程志英等, 1990; 马信祥等, 1988)。

短柄五加种子生活力测定结果表明其种子质量很差。短柄五加和刺五加既可进行有性生殖又可通过根茎进行营养繁殖(王仲礼等, 1997;刘林德等, 1997)。传粉生物学研究表明,刺五加有性生殖过程中是依赖昆虫在雌雄异株间进行异花传粉(另文报道),这种繁殖系统有广泛的基因重组并使其后代有丰富的遗传多样性,以利于对不同环境的适应。实地考察也发现实生苗的存在(刘林德等, 1997),试验地种植种子出苗率为 10%(另文报道)。短柄五加为两性花,具雌雄异熟现象,以昆虫为媒介主要在同一无性系内进行异花传粉,即广义的自花传粉(王仲礼等, 1997)。导致种子质量低下的原因很多,从短柄五加的传粉生物学(王仲礼等, 1997)来看,自交衰退可能是导致其种子质量低下的重要原因。试验地种植其种子出苗率只有 1.67%,而实地考察中,也没有发现实生苗(王仲礼等, 1997),这从另一侧面反映短柄五加有性生殖效率极低。随着人为大量挖掘短柄五加

根茎作为药材，致使自然种群大量减少，进一步加速其濒危过程。

短柄五加种子有萌发潜能者只占全部种子很小一部分（9.27%）。虽然在试验地种植条件下短柄五加饱满种子出苗率是1.67%，表明通过各种人工手段尚有提高的潜力，但潜力有限。关键问题是如何提高其种子质量，才能从根本上提高短柄五加的有性生殖率。短柄五加在自然条件下主要通过昆虫进行无性系内异花传粉，结实率为65%，人工异花传粉可以显著提高结实率（89%）（王仲礼等，1997），表明自然条件下有些花的柱头没有接受到足够花粉，所以提高传粉效率可以提高短柄五加的结实率。因短柄五加每子房5室，各有一可育胚珠，只要其中一个胚珠受精成功，整个子房即可膨大发育成果实，所以短柄五加的结实率并不能真正反映出最终形成种子的数量和质量。从本文统计结果看，成熟果实中饱满种子只占全部种子的48.18%也说明这一点。因此在采取人工方法提高传粉效率时要注意，既要增加接受花粉的柱头数量，又要增加每一柱头接受花粉的数量，才会使结实率提高的同时，有效种子的数量和质量得到相应的提高。

短柄五加种子变温层积处理可以大大缩短种子的后熟时间，这一点与刺五加相似（Wang *et al*., 1992；祝宁等，1991）。推测前期的高温处理使胚分化完成，后期的低温则促使胚体增大和诱导生理后熟所需要的激素平衡（Wang *et al*., 1992）。短柄五加种子在试验地种植后熟过程中，其细胞化学特点与变温层积处理的后熟过程稍有不同，在刺五加中也有类似情况（另文报道），产生该差别的原因尚不清楚。

总之，短柄五加种子质量差、在自然条件下后熟时间长和出苗率低可能是短柄五加致濒的主要因素。其中出苗率低与种子质量差和自然状态后熟时间长（受环境压力相应增大）密切相关。因此在保护短柄五加时，从生殖生物学角度看，关键是如何提高种子的质量和如何缩短种子后熟时间，进而提高其出苗率。由于短柄五加是无性系内的自花传粉结实（王仲礼等，1997），因而应当采取在无性系之间人工辅助授粉和人工增加传粉昆虫数量等方法提高传粉的效果，进而提高种子的质量；采取人工变温层积处理种子的方法是缩短其种子后熟时间的有效方法之一。当然，短柄五加从幼苗到性成熟植株的过程还需要经受各种环境压力的选择，这有待于从生态学角度加以进一步研究。

参 考 文 献

马信祥，杨祝良，许再富等，1988. 国家重点保护植物山红树濒危原因的研究. 云南植物研究，10:311～316

马德兹，刘惠兰，1986. 宁夏植物志. 第2卷. 宁夏：宁夏人民出版社. 33

王仲礼，刘林德，田国伟，申家恒，1997. 短柄五加的开花和传粉生物学研究. 生物多样性，5(4)：251～256

刘林德，1996. 五加科植物胚胎学研究进展. 烟台师范学院学报(自然科学版)，12:296～300

刘林德，王仲礼，田国伟，申家恒，1997. 刺五加的有性生殖与营养繁殖. 植物分类学报，35:7～13

向其柏，1985. 五加科. 见：郑万钧主编，中国树木志. 第2卷. 北京：中国林业出版社. 1772～1786

何景，曾沧江，1978. 五加科. 见：中国科学院中国植物志编辑委员会编，中国植物志. 第54卷. 北京：科学出版社. 104～106

祝宁，藏润国，刘阳明，1991. 刺五加种子生态学的初步研究. 东北林业大学学报，19:107～112

程志英，陶国达，许再富，1990. 沙椤濒危原因的探讨. 云南植物研究，12:186～190

樊汝汶，叶建国，尹增芳等，1992. 鹅掌楸种子和胚胎发育的研究. 植物学报，34:437～442

Boyd R S, Serafini L L, 1992. Reproductive attrition in the rare chaparral shrub *Fremontodendron decum-*

bens Lloyd (Sterculiaceae). Amer J Bot, 79: 1264～1272
Herrera J, 1991. The reproductive biology of a riparian Mediterranean shrub, *Nerium oleander* L. (Apocynaceae). Bot J Linn Soc, 106: 147～172
Kevan P G, Ambrose J D. Kemp J R, 1991. Pollination in an understorey vine, *Smilax rotundifolia*, a threatened plants of the Carolinian forests in Canada. Can J Bot, 69: 2555～2559
Wang Y, Zhu L, Liu R *et al*, 1992. Correlation between embryo development and levels of endogenous phytohormones during seed stratification of *Acanthopanax senticosus*. In: Fu J, Khan A A eds. Advances in the Science and Technology of Seed . New York: Science Press. 268～276
Wiens D, Nickrent D L, Davern C L *et al*, 1989. Developmemtal failure and loss of reproductive capacity in the rare palaeoendemic shrub *Dedeckerra eurekensis*. Nature, 338: 65～67

图版说明　Explanation of plates

E:胚．　En:胚乳．　Sc:种皮．

图版Ⅰ　为种子扫描电镜照片　1．示种子形状(×13)；2．示内果皮内表面(×1600)；3.示内果皮在种柄处的小孔道(×110)；4～5,7～9．均为 PAS 反应＋汞-溴酚蓝染色　4～6．果实成熟时的种子切片　4．示初期心形胚和胚周围呈强 PAS 正反应的解体胚乳囊腔(×85)；5A．示种皮及其纤维加厚的细胞壁(箭头)和胚乳细胞内大量的蛋白质颗粒 (×90)；5B．图 5A 部分胚乳细胞放大，示胚乳细胞内大量蛋白质颗粒(箭头)(×170)；6．未经固定的种子切片，苏丹黑 B 染色，示胚乳细胞中存在大量脂类物质(×160)；7～9．试验地种植一年的种子切片　7．子叶胚期(×37)；8．胚细胞中汞-溴酚蓝染色很浅，细胞内有少量多糖颗粒(箭头)(×400)；9．示珠孔端胚乳细胞中存在多糖颗粒(箭头)(×350)。

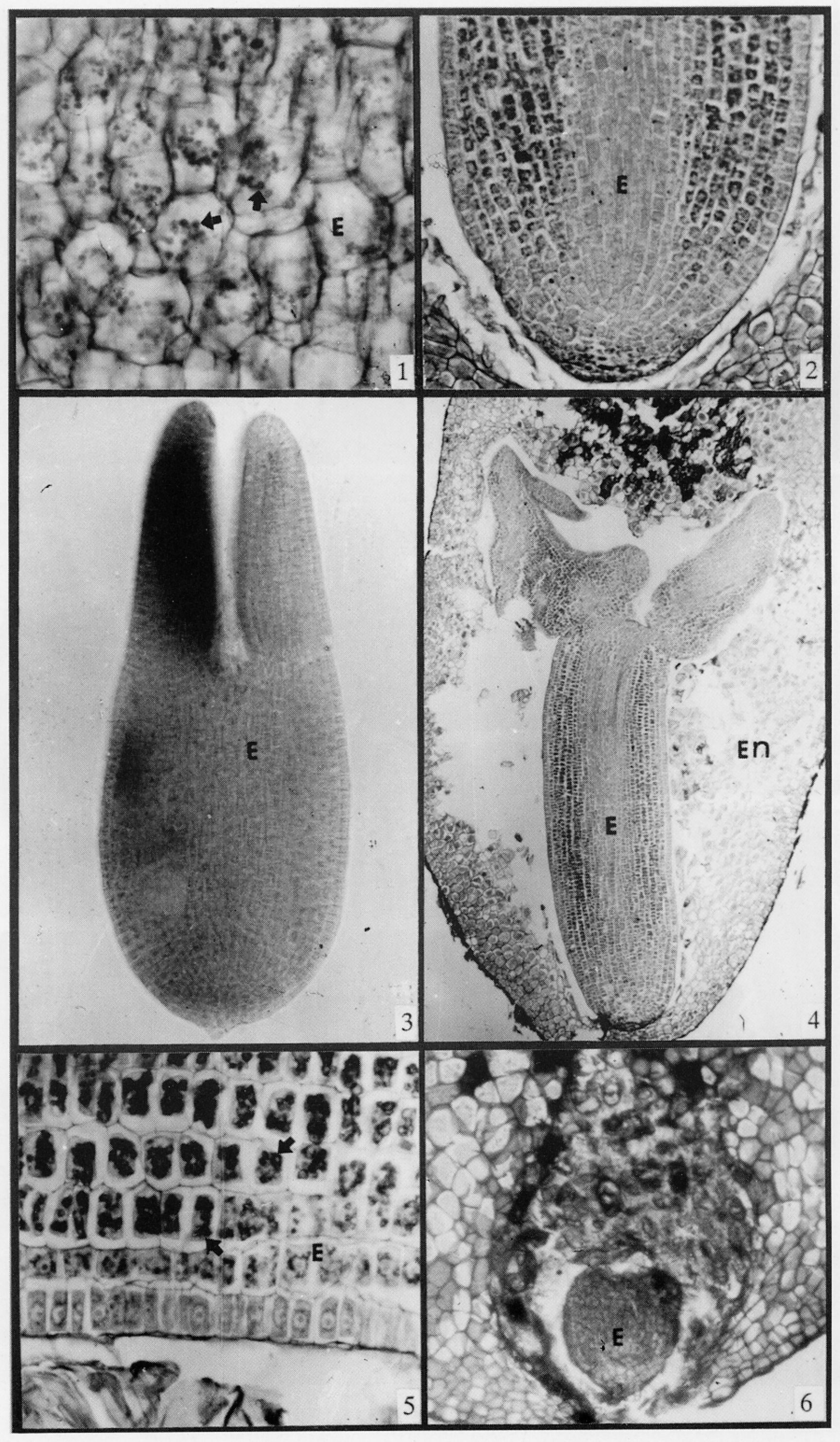
图版Ⅱ　1，3～6，均为 PAS 反应＋汞-溴酚蓝染色　1．为 20℃层积处理 3 个月种子的胚细胞，示胚细胞中汞-溴酚蓝染色较浅，并已积累一些多糖颗粒(箭头)(×760)；2．为 5℃层积处理 1 个月种子切片，示胚细胞中积累大量的多糖颗粒(×130)；3．为 5℃层积处理 1 个月种子解剖出来的胚，为子叶胚初期(埃氏苏木精染色)(×85)；4～5．为 5℃层积处理 2 个月种子切片　4．示近成熟子叶胚时期(胚未切正)(×42)；5．示胚体表皮下有 7～8 层细胞中贮存大量多糖颗粒(箭头)(×380)；6．为双温处理 6 个月的一部分种子切片，示种子仍为心形胚初期(×100)。

E: Embryo.　En: Endosperm.　Sc: Seed coat.

Plate Ⅰ　1～3. Scanning electron microscopy graphs of seeds　1. Showing the seed shape(× 13); 2. Showing the inner face of inner fruit coat (× 110); 3. Showing a small opening at seed stalk on the inner fruit coat(× 110) ; 4～5 and 7～9. Both are PAS stained and HgCl-bromophenol blue stained　4～6. Sections of seeds from the mature fruits　4. Showing a heart-shaped embryo at early stage and a sac with strong positive PAS reaction formed from degenerating endosperm cells(× 85); 5A. Showing the seed coat composed by a layer of cells having thick cell walls (arrow) and lots of protein grains in endosperm cells (× 90); 5B. Magnification of some endosperm cells from a part of 5A, showing abundant protein grains (arrow) in endosperm cells (× 170); 6. Endosperm cells from an unfixed seed stained by Sudan black B, showing abundant lipids in endosperm cells (× 160); 7～9. Sections of seeds cultivated for a year in a field　7. Showing the embryo at cotyledon-embryo stage(× 37); 8. Showing a few smaller polysaccharide grains (arrow) and slightly HgCl-bromophenol blue stain in embryo cells (× 400); 9. Showing some polysaccharide grains (arrow) in endosperm cells at micropyle (× 350).

Plate Ⅱ　1, 3～6, Both are PAS and HgCl-bromophenol blue stained　1. A section of the seed stratified for 3 months at 20℃, showing some polysaccharide grains (arrow) and slightly HgCl-bromophenol blue stain in embryo cells (× 760); 2. A section of the seed stratified at 5℃ for 1 month, showing numerous polysaccharide grains (arrow) in most cells of the embryo (× 130); 3. An embryo dissected from the seed stratified at 5℃ for 1 month, showing the embryo at early cotyledon-embryo stage (Ehrlich's hematoxylin stained) (× 85); 4～5. Sections of seeds stratified for 2 months at 5℃　4. Showing an early mature embryo (× 42); 5. Showing a lot of polysaccharide grains (arrow) in the embryo cells from 1st to 7th layer under epidermis cells (× 380); 6. A section of the seed stratified at different temperatures for 6 months, showing the embryo at heart-shaped stage (× 100).

See explanation at the end of text



See explanation at the end of text